## JP1268646

ru	D	lica	tion	ΗIL	ıe.

ANTITUMOR AGENT

Abstract:

Abstract of JP1268646

PURPOSE:To provide an antitumor agent containing a specific monoclonal antibody produced by a hybridoma prepared from an antibody-producing cell of a mouse sensitized with a mouse lymphoma cell, as an active component. CONSTITUTION:An antibody-producing cell obtained by immunizing a type-A mouse with a T-cell leukemia cell strain EL4 originated from C57BL/6 mouse is fused with a myeloma cell strain NS1 originated from a Balb/C mouse. The obtained hybridoma is screened, the screened cell capable of producing an antibody having cytotoxic activity is cloned by limiting dilution analysis and the cloning process is repeated to obtain hybridomas A1.267, A1.410 and A1.425, from which monoclonal antibodies A1.410 and A1.425 having the following properties are prepared. Immunoglobulin class, (IgG3.x); strength of the recognition specificity to cell surface ganglioside, GD2>GD3, GD1b, GD1a, GQ1b>GT1; recognition of monoclonal antibody, exclusively recognizing monoclonal antiboty A1.267 and GD2. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

-----

Courtesy of http://v3.espacenet.com

#### ⑩公開特許公報(A) 平1-268646

@Int. Cl. 4 A 61 K 39/395 5/00 C 12 N 15/00 12 P 21/00 C 07 K 15/04 21/00 C 12 R 1:91)

識別記号 庁内整理番号 ADU N-8829-4C B-8515-4B C-8412-4B D-6712-4B

49公開 平成1年(1989)10月26日

審査請求 未請求 請求項の数 3 (全21頁)

の発明の名称 抗腫瘍剤

> 顧 昭63-95724 20特

頤 昭63(1988) 4 月20日

特許法第30条第1項適用 昭和62年10月20日 日本免疫学会発行の「日本免疫学会總会・学術集会記 録第17巻 | に発表

加発 明 者 伸 彦 劣 宏 ②発 明 者 小 Æ 宗 @発 明 者 里 津 降 宏

Ħ

神奈川県小田原市板様字トノ山793 神奈川県伊勢原市池端252-2 椿ハイツ206 神奈川県小田原市浜町3-16-7

黍 (2)発明 老 池 Ł 明治乳業株式会社 勿出 顧 人

神奈川県南足柄市駒形新宿93-1 パレス東原202

700代 理 人 弁理十 戸田 親男

東京都中央区京橋2丁目3番6号

вR

1. 篠明の名称

抗躁癌剂 2. 特許請求の範囲

1. C57BL/6マウス由来のT細胞白血繊細胞株EL4 でA系マウスを免疫することにより得られる抗体 産生制胞とBalb/c系マウス由来の骨髄緩細胸株 NSI とを融合させることにより得られるハイブリ ドーマが産生し、免疫グロブリンクラスが(IeG3。 x ) であって、細胞表面ガングリオシドに対する 認識の特異性の強さにおいて、

GD2>GD3(NeuAc, NeuAc), GD3(NeuGc, NeuAc),

GD1b.GT1a. GQ1b>GT1

であるモノクローナル抗体41.267を有効成分とす る抗躁緩剤。

 C578L/6マウス由来のT細胞白血調細胞株EL4 でA系マウスを免疫することにより得られる抗体 産生制版とBalb/c 系マウス由来の骨額腫細胞株 NS1とを融合させることにより得られるハイブ

リドーマが産生し、免疫グロブリンクラスが(Ig G3. \*) であって、細胞表面ガングリオシド GD2 を認識するモノクローナル抗体 A1,410を有効成分 とする抗腫癌剤。 C578L/6マウス由来の工細的自由規劃助機EL4

で A あマウスを負折することにより得られる抗仏 商生細胞とBalb/c系マウス由来の骨骼腫細胞株 NS1とを融合させることにより得られるハイブリ ドーマが廃生し、免疫グロブリンクラスが(IeG3、 ×) であって、細胞表面ガングリオシド GD2を認

職するモノクローナル抗体A1.425を有効成分とす ス拾版館制。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は新規なモノクローナル抗体A1.267、A1. 410または41.425を有効成分とする抗腫緩倒に関 するものである.

更に詳しくは本発明は、C578L/6マウス由来の T細胞白血病細胞株EL4 でA系マウスを免疫する ことにより得られる抗体産生制脂とBalb/c系マウ ス分配線制限NSIとを総合させることにより得られるハイブリドーマが産生し、免疫グロブリンクラスが(1g.G3、x)であって、マウス及びとトの酸が網絡の対応表面の被同共通の技術関連状態であるカングリオシドをGD2/GD3(MeuAc, NeuAc)。GD3(NouGe, NeuAc)。GD1k, GT1a, GG1b/GT1の類に次く認識するモノクロナール液体A1.267を有効成分とする乾燥解析に関する

また、本長別は、C578L/5マウス由来の工棚施 白血消離高機EL4で八系マウスを免疫することに より得られる近体 溶生期面とBalb/c系マウス由 米の骨値採用過度 VSIとを機合させることにより 得られるハイブリドーマが産生し、免疫グロブリ ングラスが (IgG3、x) であって、細胞炎間ガン グリオンド GD2を認識するモノクローナル抗体AI. 410を有効成分とする時間を網に関する。

更に、本発明は、 C578L/6マウス由来の工棚麭 白血病網路株EL4でA系マウスを免疫することに より得られる抗体 産生細胞とBalb/c系マウス由 来の骨額種類数様 NSIとを融合させることにより

ローナル技体の作成する方法 (Nature, 256, 495 (1975)) を確立して以来、経路郵放表面に存在する技術特別状態に対するをイクロナール抗体を獲得しようとする技みがなされてきた。(Koprowski, H. at al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 3405(1978), Horlun, M. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 1438(1979)) これはモノフローナル技体の抗原に対する高い特異性・最級性を利用して、基礎医学においては延縮特異抗原の解析を凝固的に発展させること、確认分野においては近の的機な診察や様を狙い打ちにする治療への応用が開発されたからである。

当初こうした研究は経路拡展の拡展決定基として経路和監接自然を対象として研究された。ところがこれらの拡張に対するモノクローナル拡体は 正常 期路とも反応し、経路 和路に対する特異性と いう観点からみると期待を重切るものであったのである。

しかしながらこのようなモノクローナル抗体の 中に数は少ないながらも比較的緩緩細胞に対する 得られるハイブリドーマが意生し、免疫グロブリンクラスが (IgG3, x) であって、細路表面ガングリオシド GD2を認識するモノクローナル抗体A1.425を有効成分とする抗極振術に関する。

なお、本発明においてガングリオンドの名前(GDZ、GD3など)はSvennerholsの命名法(Svennerhols, L. J. Lipid Res. 5, 145-155 (1964))による。また、GD3のシアル酸誘導体は活気の中に起した。すなわち、GD3(NeuAc, NeuAc)、GD3(NeuAc, NeuAc)、GD3(NeuAc, NeuAc)、GD3(NeuAc, NeuGo)、GD3(NeuAc, B'(NeuGo)、LacCer, B'(NeuGo) LacCer, B'(NeuGo) LacC

### (従来の技術)

KoehlerとMilstein が抗体産生細胞と酸瘍細胞 との融合細胞(ハイブリドーマ)を用いてモノク

特異性の高いものがみられた。そこでこれら特異性の高いモノクローナル放体の結構している設成を開べたところ、接近網路表面の結構が、執ばして知る状态を設定していることが判明した。この中でもとりわけガングリオンド即ちシアル酸を有する熱脂質が特異性が高いことが判った。(Hakosoti, S. Cancer Res, 45, 1245 - 2414(1985))。そして、ガングリオンドを提供するそとノクローナル核体の中は、既にモノンアロガングリオンドを提供する1116x513-3 (Koprewski, M. et al. Soentic Celi Genetics, 5,957(1978), Regneni, J. et al. Science, 212,55(1881)))のように純の診断に使用されているものもある。

ガングリオンドに対するモノクローナル統体に は以上のほか、GD3に対してはPukal C. S. et al. J. Exp. Hed. 155, 1133-1147(1982) やNuclean, E. et al. J. Biol. Chem. 257, 12752-12756 (1982)、GD2 に対しては Cahan, L. D. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 7g, 7629-7633 Acad. Sci. USA <u>81</u>, 5767-5771(1984). Cheung, N. K. et al. Cancer Res. <u>45</u>, 2642-2649. およびSaito M. et al. Bloches, Blophys.Res. Comsun. <u>127</u>, 1-7(1985). GR2に対してはては、 T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>80</u>, 5382-5396 (1983) ペ Natoli, E. J. et al. Cancer Res. <u>45</u>, 4165-4120(1986). GR3に対しては Hirsbeysahi, Y. et al. J. Biol. Ches. <u>260</u>, 13328-13333 (1985)のような研究がある。しかし

(1982), Cheresh, D. A. et al. Proc. Natl.

これまで経鉱制設表面ガングリオシドに対する モノクローナル抗体が作られてこなかった大きな 奨別として、モノクローナル抗体を進生するハイ ブリドーマを得るに関し、ヒト短部制版で感作さ セたマウスの抗体選生制施とマウス骨髄腫制施 世合する異種免疫の方法を用いてきたことが挙げ られる。即ち、投版として投与される腫瘍期節

ナル抗体はそれほど数多く作られていないのが現

状である。

処種であるヒト山米のものであるため、ヒトの主 変組機適応抗原系(Kajor Histocospatibility Complex)であるHLAを認識するモノクローナル抗 体を産生するハイブリドーマばかりが得られ、日 めとするハイブリドーマを得る確率が非常に小さ かった。

このような状況下で本発明者らは上記の方法に 代えて、マウズリンパ系縁値無限で紹介されたマ ウスの抗体産生態をマウス骨値強制をとを強う させる同種免疫の方法を提ることにより、HLALを 返連するモノクローナル抗体を産生する不更なハ イブリドーマの生成が静陰され、マウスおよ遅近い にのな値解数の無限度回の種間共通の延ば関連であるガングリオンド、特に GD2を特異的に認 環するモノクローナル抗体を産生するハブリド ーマを極めて他半点く得ることができることを 見した。そして本発明者らはこの発見に結づいて が取ざれるモノクローナル抗体とそれを歴生する 利面されるモノクローナル抗体とそれを歴生する イブリドーで同する発明について先に特許出 載した(PCT/1987/00690)。

一方、モノクローナル核体の核原に対する強い 特異性を利用して悪性腫瘍の治療に彼立てようと する試みも特力的になされてきた。その結果が並 ジリオン ドを抗震するモノクローナル核体が腫 適の治療 に有用であることが知られ始めた(Hake sori, S. Cancer Res. 45, 2405-2414(1935))。

モしてこのようなガングリオシドを抗原とする モノグローナル抗体の一部は低に改成液用の段射 にまで進んで来ている。例えば、Dippoldらがと トメラノーマ制磁体Six-HEL28をマウスに免疫する ことにより作り出し(Dippold V. G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>77</u>, 6114-6118(1980)), Pukelうが603を近渡することを示した(Pukel, C. S. et al. J. Exp. Med. <u>155</u>, 1133-1147(1982)), が603をノクローナル抗体R24を、Houghtonらが転移性健康を持つメラノーマ連和129年に2週間にわたり約83回全身投与したところ、3例に顕著な雑値の耐かを送めた(Houghton, A. N. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>82</u>, 1242-1246 (1985)),

葉性悪性腫瘍と上皮性ガンの治療する方法に関す る発明が、特別昭62-289524 として出願されてい る。また、Cheungがヒト神経芽細胞株LAN-1をマ ウスに免疫して得られた抗 GD2モノクローナル抗 体3F8を12例の転移性腫瘍患者 (メラノーマ6例、 抽経準制陶験 4 例、長肉腫 2 例) に全身投与して、 3例に顕著な効果が認められたと報告している (Cheung, N. K. et al. Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 27, 318(1986)). 更にはIrieらはメ ラノーマ晶者の末梢血リンパ球をEBウィルスで株 化することにより得られた細胞が生産する抗 GD2 モノクローナル抗体L72 を8人の患者の合計21箇 所の転移性メラノーマに補体と共に投与したとこ ろ、16箇所で退縮が認められ、このうち1D箇所で は完全に逍遥したと報告している (Irie, R. F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8694-2602(1026))

そして本発明者らは上に記した特許出願(PCT/ JP87/00690)の実施例に記載したモノクローナル 抗体の中の一つにそれ自身で強い抗腫瘍性を持つ ものを見い出し、用途発明(抗腫瘍剤)として特許 出順を行なった(特質昭63-21317)。

(発明が解決しようとする問題占)

本発明者らの先の出解(約解期63-21317)は、それまでのモノクローナル抗体を有効成分とする抗 機態期の新どがメラノーマに対する効果であり、 一部所は延昇接を退縮させるものであって、適用 期はごく扱られたものであったのに対し、白血 病の知き感性リンが疑のモノクローナル抗体によ る的線効果を見いだした点に大きな意味がある。

しかしながら同一の名称で呼ばれる趣館であっ ても韓雄の多様性は大きく、一つの抗雄菌剤があ める延賀にもして著効を示すとは個もず、又雄 雄自体が抗難値前の役号を継続するうちに藻剤に 対して振航性を示すようになる場合が多い。その ために、横の御娘に関して前機関始から完成まで 平一の抗難値剤で取りることは少なく、複数の 郷別が求められている。 (問題点を解決するための手型)

そこで本発明者らは更に続けて先に出版した方 法と同じでハイブリドーマを創製して、ハイブリ ドーマが産生するモノクローナル抗体のうち抗凝 傷効果のあるものを提測してきたところ、上述の モノクローナル抗体A1.257、A1.410及UA1.425が 歌い抗酸傷効果を持つことを発見し、本作明を完 成れた。

即ち本発明者らはマウス下線総自止線組織核と 移植されたマウスにモノクローナル核体11,267、 A1.41の又は41,425を投与したところ、これらモノ クローナル核体がこの担当マウスの寿命を署明に 疑反し、或は経療を完全に拒絶させることを認め たのである。

本発明はモノクローナル抗体A1.267、A1.410又 はA1.425を有効成分とする新規な抗腫瘍剤である。

そして、本発明に係るモノクローナル抗体 A1. 267 を変生するハイブリドーマA1.267は微工研に FEPM P-9992として寄託され、モノクローナル抗 体 A1.410 を産生するハイブリドーマA1.410は微

工研にFEPN P-9993として客託され、そして、モ ノクローナル航体 A1.425 を選生するハイブリド ーマA1.425は横工研にFEPN P-9994として客託さ れている。

本発明の核雑値制を上記モノクローナル統体を 有効成分として製剤化するには公知の方法を適用 すればよい、 投与方法としては感性リンパ腫の治 軟に用いる関係上、 点滴注射による投与が好まし い。

注射張の製剤には、生理的食塩水、誠菌水リン ゲル被等の水溶性溶剤、非水性溶剤、等吸化剤、 無痛化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、整稠 化剤、緩衝剤、乳化剤等を任意に使用し得る。

一例として、生理的食塩水(塩濃度約0.9%) に ヒト血清アルブミンを 5%にモノクローナル抗体 を適量含むものを関裂して注射例とする。

モノクローナル抗体は点滴注射製剤中 $0.1\mu_E$   $\sim 100 mg/m R$ 、好ましくは $1\mu_E \sim 1 mg/m R$ 含有される。

点滴投与量は症状、腫瘍の進行、年齢、性別等

に応じて 50~1,000≈2であり、毎日或は適当に日 をおいて与える。

以下に本発明を実施例により具体的に説明する。

## 実施例1(ハイブリドーマの作器)

C578Lマウス由米のT紅胞接ば株に4を107 細胞/マウス、1 個/選、4 選問に至りA系マウスの設設内に接種し、最終疑想後3日目に神職を揺出してよる常法により組織特養被8PM1540(GIBCO社関)中の細胞所連強として認想した。

一方融合の親細胞としてBalb/c系マウス由来の 骨髄腫細胞株NS1を培養して10<sup>7</sup>細胞用悉した。

これらの細胞の融合は KochlerとMilsteinの方 法(Mature, <u>256</u>, 495(1975))に従い、以下のよう に行なった。

前端のようにして製製した時間の浮遊組総と作 體腱網整を開路数で5:1となるように違心チュ ープ内で混合し、500r.p.a.で5分端心した後上 清を捨て、RPKI1540で満該40%(v/v)に割裂した ポリエチレングリコール(メルシセ製:平均分子 最4,000)を0.2×2加えて2分加よく復作報合した。 その後これに5×2のPRF11640を1 割づつ3分間か けて添加して希釈し、500r.p.m. で5分通心した 核上前を持てた。次いで加勤を相よ時地(8PF11640 対地に 10%(v/v)つシ前児血清を加え、最終濃度 でヒポキサンチン 10<sup>-1</sup>州、アミノグテリン4× 10<sup>-1</sup>州、チミジン1.6×10<sup>-1</sup>州を加えたもの)に浮遊 せせて 100 m 4/次の割合で96穴マイクロプレート に分法した。

温波37で、c0。: 空気=5:95 の気料でこれを 暗着し、結算3日目および6日目に BAI崩潰で精 地交換を行なった。それ以後は3日毎にIII増増 (MAI増進からアミノブテリンのみを除いた増増) で相違交換を行なった。

除薬を続け、超塩のコロニーの形成が認められるようになった時点(約10~14日(1)で培養上清中の抗体活性を頻定してスクリーニングを行なった。 スクリーニングはウサギ血清補体を併用する期的 配き試験法を用いた。具体的には、標的となる 1570にマウス由来の下面影響係体能4の細数が接着

8alb/c系のヌードマウスの敷設にブリステン
0.5n2 投与し、7日後に実施例1により得られた
ハイブリドーマ41.267(FERN P-9992 ) 約5~10
×10\* 網路を観磨内接發して数水化を行なった。
1~2 週間接に超水を提取し、3,000c.p.a.. 15
分間の減心により上消上層部分のブリステンと沈 観物である劃粒塊を取り除いたモノクローナル核 体が含まれる中間州の部分を到板した。

上記により回収された常被10m3に複像アンモニウムを最終機定50%となるように加えて、場新した。これを10,000c,p.m.、30分間の這つにかけ、沈遠した分面をPBS(pll7.200.01#規程維持版に0.15% NoC1を加えた頻散機衡電源被10m3に溶かした。この情報を PBS 1,000miに対して3回透析を繰り返し、免疫グロブリン分辨とした。

次いで減免疫プロプリン分両を、0.038 NaCaを 含むPIE.0の場像機関級に対して十分に選折した。 別にこれと同じ経測被で平衡化しておいたイオン 受機間DE52カラム(ワットマン社製)に減速折板 をかけ、0852カラムに吸着されなかった個分を回 (細胞菌皮 5 × 10<sup>4</sup> 観/m²) 20 μ 2 . ウサギ血消結体 20 μ 2 k 3 よ 5 坊 養上前20 μ 2 を混合している復作し つつ37でで45分間反応させた。反応終了後次冷し たりパンブルー水消波50 μ 2 を加えた後、消彼 鏡で観察してトリパンブルーを取り込みだ根 2 3 成 鏡により培棄上前の超路障害活性を判断した。

スクリーニングを行なったハイブリドーマ 486 様のうち、細胞障害活性をもつ流体を選生するも のが14模得られ、そのうち1様のハイブリドーマ について、膜界条数法によりクローン化した。 更 にクローニングを触り返して安定で単一の細胞山 来のハイブリドーマ41,567を掛た。

門様にして、ハイブリドーマAI.410を得た。 また、同様にして、ハイブリドーマAI.425を得

実施例2(モノクローナル抗体A1.267の特製)

収した。この回収された額分を PBSに対して透析を行なったものを精製 IsG抗体とし、モノクローナル抗体 A1.267を得た。

# 実施例3(モノクローナル抗体A1.267の特異性)

モノクローナル抗体AI.267が認識しているガン グリオシドを決定するために、凍層クロマトグラ フィー(以下TLCと称す)上での酸素免疫染色法を 行なった。

(1) ヒトメラノーマ細胞株 x14 のガングリオシ ド分頭、ガングリオシド 組品および中性精脂資績 品の整刻

ヒトメラノーマ細胞株UCLA50-M14(以下M14という)はカルホルニア大学の8.1ria博士より入手したもので、M14のガングリオシド分画の翻駁はToi.
T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 53
92-5396(1983)に従った。

ガリグリオシドCM1、GD1a、GD1b、GT1b はウシの脳から類裂し、Kanfor、J. N. Methods Enzynol. 14,660-664(1969) に従って符製した。G01bはヤトロン社から購入した。ヒト脳の GM3はスウェー

デンのGoteborg大学のL. Svennerhola博士から入 手した。 GM2とGD2はそれぞれGM2とGD1bから、ウ シ専丸β-ガラクトシダーゼ(アメリカのミシガン 大学のJ、V. Jourdian博士から入手)を用いて調 双した。ヒトミエリンのGM4とヒト脳のGT1a は東 京部臨床医学総合研究所の有體博士から入手し た、クマ赤血球のGD3(NeuAc, NeuAc)、GD3(NeuAc. NeuGo), GD3(NeuGo, NeuAo), および GD3(NeuGo, NeuGc)は東京都臨床医学総合研究所の橋本博士と 鈴木明身博士から入手した。LacCer, GgOsaCer, および GeOs.CarはそれぞれGM3. GM2. GM1から弱 動で処理し、イアトロビーズカラムクロマトグラ フィーで精製して開製した。GlcCerはTal, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5392-5 396(1983) に従って翻製した。GbOs, CerとGbOs, C erはSupelco社 (アメリカ、ペンシルパニア州、 ベラフォンテ)から購入した。

### (2) TLCの方法

メルク社製のシリカゲルを強和済みの TLCプレート(シリカゲル60」(厚さ200gm)と同じくメル

ク社製のシリカゲルを終布がみのTLCプラスチックシートを使用した。クロマトグラムの展開市場はクロロフォルム人メタノール/0.22% CaCl。水路 厳を背積比55/45/10としたものを用いた。なお、TLCプレート上に展開されたガングリオンドを協会する場合にはレゾルシノール (resorcinel) 染色を、中性制耐質の染色にはオルシノール(orcinel) 染色を削りた。

- (3) TLCプレート上でのモノクローナル抗体 が 1.267による酵素免疫協会法
- ガングリオンドのTLC料で後、TLCプレートをウ シ血浦アルブミン「味とポリビニールとロリドン (polyvinylpyrolidone) 1 %とを含有する頻度域 地事族に接した。空気中で乾燥させた後、ブレ ートをモノクローナル結体料1.267消後(10 mg/mg) と 2 時間 25 ℃で反応させた。次に頻度緩緩組消候 (以下PBSと称す)を5 間交換しつつその中でクロ マトグラムを残滞した。そして周珠ワウビベルオ キンダーゼを納合させやギ気マウス1ga63 よび1 のお飲みをこのクロマトグラムと25℃で29端間反応

させた。再び PBSを5 図交換しつつその中でクロマトグラムを洗冷した。換色に当たっては 400 μ e/m10 O・フェニレングアミンと0.12%の過酸化 水満を含むクエン酸ー燐酸酸酶核(pH5.0、80mM) と用い、15分間反応させて、発色させた。その後 水に浸して反応を停止させた。

- (4) オングリオンド 帕品混合物及び #14 のガングリオンドのモノクローナル航体#1.267と反応させた TLCプレート上での酵素免疫染色流の 朝果 第1 回社をのレーンから、ガングリオンド 輪島の混合物(GR3+GR2・GR1+GD3+GD2)をTLCにかけてレゾルシノールで染色したもの、ヒトメラノーマ 翻窓 #14のガングリオンド分詞をTCLにかけてレゾルシノールで染色したもの、N14 のガングリオンド分詞をTCLにかけた後#1.267 で酵素免疫染色を行なったものである。(レーン番号3)
- この図のレーン番号 3 で示されるように、モノ クロナール抗体 A1.267はガングリオシド GD 2 と GD 3 とに反応している。

その他のガングリオシド純品および中性糖脂質

銭品についても各々TCLにかけた後モノクローナル抗体A1.267で酵素免疫染色を行なった。これらの結果については図には示さず、第1図の内容と合わせて、A1.267との反応性を表1に示す。

43

ガングリオシド	反応性	ガングリオシド	反応性
GD3	++	GH3	_
GD2	***	GM 2	-
GD1a	-	GMI	-
GD1b	**	GlcCer	-
GTIa	**	LacCor	-
GT1b	+	GgOs₃Cer	-
CQ1b	++	GgOs4Cer	-
GT3	-	Gb0s₃Cer	-
GT2	-	Gb0s.Cer	-
GN4	-		

+++:強い、++:中程度、 +:軽い、若しくは痕跡程度、-:除性

表1から分かるように本発明のモノクローナル 抗体はモノーシアロシルーガングリオシド (GM4、 GM3、GM2およびGM1)、および中性糖脂質 (GloCer、 LacCer, GgOs, Cer, GgOs, Cer, GbOs, Cer & & U GbOs.Cer) とは反応しない。

即ち、A1.267 はNeuAcα2→8NeuAcα2→3Ga1と

(NeuAc, NeuGe)、GD3(NeuGe, NeuAc)、およびGD3 (NeuGc, NeuGc))とモノクローナル抗体のTLCプレ ート上で酵素免疫染色法の結果は第2回に示され ている.

第 2 図 (A) は 4 稲 桁 の GD3 を TLC に かけ、 レゾル シノールで染色したものである。左からガングリ オシド純品の混合物 (GN3+GM1+GD3)、レーン番 号 1 はGD3(NeuAc, NeuAc)、レーン番号 2 はGD3 (NeuAc. NeuGc)、レーン哲号3は GD3(NeuGc, NouAc)、レーン番号4は GD3(NeuGc, NeuGc)であ る。第2回(D)はA1,267によるTLCの酵素免疫染色 の結果である。レーン番号と GD3の種類は第2回 (4)と同じである。

A1.267が反応したのはGD3(NeuAc, NeuAc)とGD3 (NeuGo, NeuAc)である。この結果はA1.267のガン グリオシドの認識には三鱗の内部シアル酸が必須 であり、かつ該シアル酸は NeuAc殘態でなけれ ばならないことを示している。 内部シアル酸が NeuAcでなく、NeuGcの時は認識されていない。-方、末端シアル酸残基はNeuGc、NeuAcのいずれで いう三糖構造を持つGD3、GD2、GD1b、GTla、GT1b およびGQ1bと反応し、他のガングリオシドとは反 応しない。最も強く反応するのが GD2であり逆に 最も反応が弱いのはGT1bである。 GD2にガラスク - ス1 個が付加されたGD1bは反応性が弱くなり、 GD1bに更にシアル酸が未端ガラストース残揺に付 加されたGT1bはもっと反応性が落ちる。この知見 からシアル酸が末端のガラクトース残基 (GDIb) や末端のシアン酸残盐(GT1b)に付加することに よって、抗原決定基である NeuAc α2→8NeuAc α2 →3Galはマスクされることが示唆される。一方、 GT1bの末端シアル酸残基にシアル酸が付加した GQ1bはGD1dのレベルまで反応性が回復する。GT1a は反応性はGQ1bと同程度であるから、GQ1bの認識 部位は束備の三糖であるはずである。以上から、 A1.267はガラクトース疫基(場所は内部、末端を 問わない)に結合したジシアロシル残基「NeuAc α2→8NeuAcα2→3」を認識していることが判明し t.

次に4種類の GD3(GD3(NeuAc, NeuAc)、GD3

もA1.267に認識されている。すると、A1.267の抗 原決定接は Sia a 2→8NeuAc a 2→3Gal授品となる はずである。

以上の結果をまとめると、モノクローナル抗体 A1.267の細胞表面ガングリオシドに対する認識の 特異性は、

GD2>GD3 (NeuAc, NeuAc), GD3 (NeuGc, NeuAc), GDIb. GTIa. GOIb>GTI

であると考えられる。

この特異性のパターンは本発明者が先に出願し たPCT/JP87/00690の実施例に記載のモノクローナ ル抗体MoA2と全く同じである。但しMoA2は免疫グ ロブリンのクラスが(IgN、×)であって、A1.267 のクラス(IgG、x)とは異なっている。

### 実 底 例 4 (モノクローナル 抗体 41.410の 精 類)

Ballvc系のスードマウスの観整にプリステン
0.5m2 役分し、7日後に実施例1により符られた
ハイブリドース1,410(FRRM P-199331) 約5~10
×10<sup>4</sup> 細巡を観測的接種して概水化を行なった。
1~2 週間後に超水を採取し、3,000で、p.m.、15 分間の違心により上前上層部分のプリステンと従 部等である知能減を取り除いたモノクローナル成 体が含まれる中間原の部分を回収した。

上記により回収された消滅10m3に破骸アンモニ ウムを放料債度50%となるように加えて、場折した。これを10,000r.p.m.、30分間の適心にかけ、 次第した分面をPBS(pH7.2の0.01%類散離漸級に 0.15% Mac2を加えた消散板制盤将被10maに溶か した。この溶液を PBS 1,000maに対して3回透析 を繰り返し、免疫グロブリン分間とした。

次いで該免疫グロブリン分離を、0.03M Nac2を 含むpH8.0の頻酸暖階級に対して十分に透析した。 別にこれと同じ緩電液で平衡化しておいたイオン 交換級的DE52カラム(ワットマン計数)に移浦転換

### (2) TLCの方法

メルク社製のシリカゲルを塗布済みの TLCプレート「シリカゲル60」(厚さ200μm)と同じくメルク社製のシリカゲルを塗布済みの TLCプラスチックシートを使用した。クロマトグラムの最関連体

をかけ、DE52カラムに吸着されなかった両分を囲 収した。この回収された瀬分を PBSに対して透析 を行なったものを相製 IgG抗似とし、モノクロー ナル抗体をA1.410を得た。

# 実施例5(モノクローナル抗体\*1,410の特異性)

モノクローナル杭体AI.410が認識しているガン グリオンドを決定するために、海門クロマトグラ フィー(以下TLCと称す)上での酵素免疫染色法を 行なった。

# (1) ヒトメラノーマ株N14 のガングリオシド分 両と結婚質純品の製製

M14のガングリオンド分詞の測復はTai, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>80</u>, 5392-5386 (1983)に従った。

ガリグリオシドGMI、GDIa、GDIb、GTIb はウシの脳から顕複し、Kanfer, J. N. Methods Enzymol. 1. 660-664 (1969) に従って特別した。GQIbはヤトロン社から購入した。ヒト扇の GR3 はスウェー デンのGotebors大学のL. Svennerholm間土から入 手した。GR2とGD2はそれぞれGY2とGDIbから、ウ

はクロロフォルム/メタノール/0.22% CaCl。水溶 絨を容積比58/45/10としたものを用いた。 TLCブ レート上に疑問されたガングリオンドの絵色には レゾルシノール (resorcinol) 染色を、中性結而 質の染色にはオルシノール(orcinol) 染色を用い

## (3) TLCプレート上での酵素免疫染色法

ガングリオンドのTLC昇で後、TLCプレートをウ りを開アルブミン1%とポリビニールピロリドン (polyviny)prolidone) 1%とを含有する構像機 衛塩商級に浸した。空気中で乾燥させた後、プレートをモノクローナル統体消機(10με/=ε)と2時 間25℃で反応させた。次に増齢較衡単溶酸(以下 PBSと解す)を5回交換しつつその中でクロマケー するを洗浄した。そして西洋ワウビベルオキング ・世を組合させたヤギ状マウス1度むまび1億料版体 をこのクロマトグラムと25℃で2時間反応させた。 再び PBSと 5回交換しつつその中でクロマトグラ ムを洗浄した。染色に当たっては 400με/=ε00-カンデミンと0.12%の過酸化水率を含む クエン酸-燐酸低清液(pH5.0、80m×) を用い、15 分間反応させた。その物、水に浸して反応を停止させた。

(4) M14 のガングリオシドのモノクローナル抗体とを反応させた TLCプレート上での酵素免疫染血法の誘導

第1 頭は左のレーンから、ガングリオンド網品 の混合物(GN3+GN2+GN1+GD3+GD2)をTLCにかけてレ ゾルシノールで映色したもの、ヒトメラノーマ観 塩はN14のガングリオンド分両をTCLにかけてレゾ ルシノールで映色したもの、N14 のガングリオシ ド分面をTCLにかけた像A1.410 で酵素免疫映色を 行なったものである。(レーン番号5)

この図のレーン番号 5 で示されるように、モノ クロナール抗体 A1.410 は G02 にのみ反応している。

その他のガングリオシド病品および中性制器質 統品についても多々TCLにかけた後モノクローナ ル粒体AI.410で除着免疫染色を行なった。これら の結果については関には示さず、馬1関の内容と 合わせて、AI.410との反応性を表2に示す。

(NeuAc, NeuGo)、G93(NeuGo, NeuAc)、およびGD3 (NeuGo, NeuGo))とモノクローナル技体Al.410のT LCプレート上で移消免疫染色法の結果は恵2間の (C) に示されている。Al.410はこれらの何れと も反応しなかった。

以上のように、少なくとも反応性試験を行なったガングリオシドの範囲内ではモノクローナル抗体 41.410 は 頻恵 表面 ガングリオシドに対しては 602とのみ反応した。

	3%	2	
ガングリオシド	反応性	ガングリオシド	反应性
G03	-	G#3	_
GDŻ	***	GM 2	-
G01a	-	GN1	
GD1 b	-	GlcCer	-
GT1a	-	LacCer	-
GT1b	-	GgOs, Cer	
GQ1b	-	Gg0s,Cer	-
G73	-	Gb0s, Cer	-
GT 2	-	Gb0s.Cer	-
GN4	-		

+++: 強い、++: 中程度、 +: 弱い、若しくは痕跡程度、-: 除作

表2から分かるように本発明のモノクローナル 抗体51,410はモノーシアロシルーガングリオシド (GM4、GM3、GM2およびGM1)、および中性制度な (CleCer、LacCer、Gg0s,Cer、Gg0s,Cer、G0s,Cer、Cb0s,Cer すおよび500s,Cer)とは反応しない。

次に4種類の GD3(GO3(NeuAc, NeuAc)、GD3

## 実施例6(モノクローナル抗体41.425の精製)

上記により回収された溶板10m2に破骸アンモニウムを最終遺炭50%となるように加えて、単折した。これを10,000r.p.m.1、30分間の適心にかけ、沈遊した分画をP85(E17.200。01%損除観筒液に0.15M NaC2を加えた燐酸緩衝度溶板)10m2に溶かした。この溶液を PBS 1,000m2に対して3 回透析を繰り返し、免疫ゲロブリン分損とした。

次いで該免疫グロブリン分函を、0.03M MaC2を 含むpH8.0の構能越衝被に対して十分に透析した。 別にこれと同じ硬構被で平衡化しておいたイオン 交換樹脂DE52カラム(ワットマン社製)に該透析級 をかけ、DE52カラムに吸着されなかった調分を圏 収した。この回収された調分を PBSに対して透析 を行なったものを精製 Igの抗体とし、モノクロー ナル抗体 AL、425を得た。

## 実施例7(モノクローナル抗体A1.425の特異性)

モノクローナル杭休AI.425が認識しているガン グリオシドを決定するために、薄層クロマトグラ フィー(以下TLCと称す)上での酵素免疫染色法を 行なった。

(1) ヒトメラノーマ株 #14 のガングリオシド分類と特新質純品の類類

M14のガングリオシド分面の調製はTai, T. ot<sup>\*</sup> al.,Proc. Natl. Acad. Sci. USA <u>80</u>, 5392-5396 (1983)に従った。

ガリグリオンドGM1、GD1a、GD1b、GT1b はウシの脳から開覧し、Kanfer, J. N. Methoda Enzywel. 14,660-664(1869) に使って材製した。GD1bはヤトロン社から購入した。ヒト脳のGD3はスウェーデンのGotebors大学のし、Svennerhola間生から入手した。GR2とGD2はそれぞれGR2とGD1bから、ウ シ電丸β-ガラクトシダーゼ(アメリカのミシガン 大学のJ. W. Jourdian同さから入手) を用いて調 製した。ヒトミエリンのGM4とヒト脳のGT1a は正 数値版は医学整合研究所の有質は士から入手し た。ウマ素直蝶のGD3(NeuGe, NeuAe)、GD3(NeuGe, NeuGe)、GD3(NeuGe, NeuAe)、および GD3(NeuGe, NeuGe)は東京都確接医学総合研究所の橋本村士と お水明身材士から入手した。LacCer、Gg0s,Cer, および Gg0s,Cerはそれぞれ673, GR2, GR1から紛 枝で処理し、イアトロビーズカラムクロマトグラ フィーで解裂して開設した。GlcCerはTai, T. et al. Proc, Natl. Acad. Sci. USA <u>80</u>, 5382-5 386(1983) に使って測裂した。Gb0s,CerとCb0s,Cer にはSupelco社 (アメリカ、ペンレルバニア州、 ペラフォンテ)から購入した。

### (2) TLCの方法

メルク社製のシリカゲルを強有許みの TLCプレート「シリカゲル60」(原さ200μm)と同じくメルク社製のシリカゲルを強有済みの TLCプラスチックシートを使用した。クロマトグラムの異語常媒

はクロロフォルム/メタノール/0、22% Cacl。水構 液を容視比55/45/10としたものを用いた。 TLCプ レート上に展明されたガングリオンドの染色には レゾルンノール (resoccinol) 染色を、中性輸脂 質の染色にはオルシノール(orcinol) 染色を用い

(3) TLCプレート上での酵素免疫染色法

ガングリオンドのTLC科了後、TLCプレートをウ 少血情アルブミン1 %とボリビニールピロリドン (solyvilaylpyrolidone) 1 %とを含有する頻微硬 樹塩溶版に疑した。空気中で後後させた後、プレートをモノクローナル核体溶板(10 m g/m2) と 2 時 で25でで反応させた。次に頻微観測型溶液(以下 PBSと振す)を 5 間交換しつつその中でクロマトグ ラムを洗浄した。そして西洋フサビベルオキンダ 一世を結合させたヤギ族マウスIgGおよびIgN版体 をこのクロマトグラムと25でで2時間反応させた。 所び PBSを 5 間交換しつつその中で400m g/m200-フェニレングジミンと0.112%の高能化水瀬を含む クエン酸ー燐酸酸糖液(pil5.0、80mM) を用い、15 分間反応させた。その後、水に浸して反応を停止 させた。

(4) N14 のガングリオシドのモノクローナル抗体とを反応させた TLCプレート上での除素免疫染色法の結果

第1 関は左のレーンから、ガングリオシド結晶 の複合物(GN3-GH2+GN1-GD3+GD2)をTLGにかけて レ ゾルシノールで験色したもの、ヒトメラノーマ制 酸株N14のガングリオンド分所をTCLにかけてレゾ ルレノールで験色したもの、814 のガングリオン ド分両をTCLにかけた後A1.425 で酵素吸度染色を 行なったものである。(レーン番号6)

この間のレーン番号6で示されるように、モノクロナール核体41.425は502にのみ反応している。 その他のガングリオシド純品および中性制 階質 網品についても各々TCLにかけた後モノクローナ ル鉱体41.425で酵素反換色を行なった。これら の制果については固には示さず、第1割の内容と 合わせて、41.425との反応性を表3に示す。

表 3

ガングリオシド	反応性	ガングリオシド	反応性
GD3	-	GM3	-
GD 2	***	GM 2	-
GD1a	-	GM1	-
GD16	-	GlcCer	-
GTla	-	LacCer	-
GT1b	-	GgOs <sub>3</sub> Cer	-
GQ1b	-	GgOs.Cer	-
GT3	-	GbOs₃Cer	-
GT2	-	GbOs₄Cer	-
GM4	-		

+++:強い、++:中程度、

+:弱い、若しくは痕跡程度、-:陰性

表3から分かるように本発明のモノクローナル 技体A1.425はモノーシアロシルーガングリオシド (GM4、GM3、GM25よびGM1)、および中性制新費 (GlcCer、LecCer、GeOs,Cer、GOos,Cer、GbOs,Cer およびGbOs,Cer)と比反Cr Goos,Cer、GbOs,Cer

次に4種類の GD3(GD3(NeuAc, NeuAc)、GD3

## <u>実施例8 (モノクローナル抗体 A1.267の抗腫瘍効</u> 果その1)

実験動物としては C578L/Gマラスと対照都は14 低、試験部はモノクローナル抗体の投存量により 2 郡に分け、各々5 医使用した。移植腫瘍には C57/S16を旧元、2 ×10\* 領板腔内に接種した。翌日 増酸緩製塩額核0.2m \*に潜かした100 m \*E 又は500 m \*E のモノクローナル抗体11.227 を映響形に、対 処部には同量の減煙破消垢取減のみを短距内に投 少し、マウスの生死を80日間額終した。

結果を表4に示す。なお、抗腹癌効果の判定に はMSD(Median Survival Day; 生存日数中央値)と ILS(Increased Life Span=(T-C)/C; 延命率)を 用いた。

また第3圏には対称群とA1.267を500με投与群 について、腰螂細胞移植後の日数軽過に対して生 見しているマウスの割合をグラフに示す。

(Neudc, NeuGc)、GD3(NeuGc, NeuAc)、およびGD3 (NeuGc, NeuGc))とモノクローナル抗体A1.425のT LCプレート上で酵素免疫染色法の結果は第2図 (C)に示されている。

第2回(4)は4種類のGD3をTLCにかけ、レゾル レノールで換色したものである。左からガングリ オンド純品の連合物(GR3・GR1・GD1)、レーン番号 1 はGD3 (Revic, Newsle)、レーン番号 2 はGD3 (Rev Ac, Newsle)、レーン番号 3 はGD3 (Revic, Newsle)、 レーン番号 4 はGD3 (Newsle, Newsle)である。第2 図(6)はA1.425によるTLCの酵素処仮染色の耐果で ある。レーン番号とGD3の種類は第2 図(4)と同じ である。この図の(6)から利るように、A1.425は これらの何れたも反応しなかった。

以上のように、少なくとも反応性試験を行なったガングリオシドの範囲内ではモノクローナル抗体 A1.425 は 組 漁 表面 ガングリオシドに 対しては GD2とのみ反応した。

ぞ 4 モノクローナル抗体 A1.267の T 細胞白血病 EL4 に対する抗腫 傷効果 (終酶 細胞 数 2 × 10\*)

群 投与量 M.S.D. I.L.S. 6.0 日間 (μg) (Η) (%) 生投数 対照群 0 22.0 0 0/14 100 >60.0 >172.7 3/5

2/5

# 実施例 9 (モノクローナル抗体 A1.267の抗腫 多効 果その 2)

対照群の動物数を9 匹、接種期路数を1×10<sup>4</sup> 個、 接種方法を皮下移植、モノクローナル抗体の投与 量を500μπだけとした他は実施例 8 と同じ条件で 実験を行なった。

結果を表5に示す。抗腫瘍効果の判定は実施例 8と同じ値を使用した。

第4回は第3回と阿様に対照群とA1.267を 500 με 投与群について、腫瘍無胞移植後の日数経過 に対して生命しているマウスの割合をグラフに示

投与群

500 50.5 129.5

したものである。

**%** 5

## モノクローナル抗体A1.267の T細胞白血病EL4に対する抗腫癌効果 (接級細胞数1×10°)

er e	投与量 (μg)	MSD (日)	I L S	60日間 生残数
対照群	0	22.5	0	0/9
投与群	500	>60	>166.7	4/5

実施列8 および実施例9 の結果から判るように、 モノクローナル抗体A1、267の投与によりマウスT 細胞白血病の増殖は等しく抑制され、成は移植設 疫は振時されるに至ったことが示された。

# 実施例10 (モノクローナル抗体 k1.410の抗腫瘍 効果その1)

実験動物としては C578L/6マウスを対照群は14 15. 試験群はモノクローナル抗体の投与量により 2. 群に分け、各々5 既使用した。移植鉄路には C57/BL6と阿系(syngonoic)の丁超路自血病超監株 BL4を使用し、2×10<sup>4</sup> 低度腔内に接続した。翌日 燐酸酸塩 航版 18,2 sak:溶かした10の p s ス kt 500 μ s のモノクローナル抗体 kl 1,410 を試験部に、対 服群には同量の接機額補塩類減のみを腹腔内に投 なし、マウスの生死を80日間観察した。

結果を数6に示す。なお、抗種協効果の判定に はMSD(Median Survival Day; 生存日数中央値)と ILS(Increased Life Span=(T-C)/C; 延命率)を 聞いた。

また第5 図には対称罪とA1.410を500μα投与群 について、腫瘍解應移植後の日数経過に対して生 壊しているマウスの割合をグラフに示す。

# 表 6 モノクローナル抗体 A 1.410の T細胞白血溶 E L 4 に対する抗腫 編 効果 (接種細胞数 2×10<sup>4</sup>)

ATF	投 与 虽 (μg)	MSD (B)	I L S	60日間 生残数
对照群	0	22.0	0	0/14
45. 11. 196	100	>60.0	> 181.7	4/5
投与群	500	30.5	43.2	2/5

# <u> 実施例 1 1 (モノクローナル抗体 A1.410の抗穀脂</u> 効果その 2)

対照群の動物数を9匹、接種制施数を1×10<sup>6</sup>個、 接種方法を皮下移植、モノクローナル抗体の投与 量を500 μ g だけとした値は実施例10と同じ条件 で実験を行なった。

結果を表7に示す。抗腫瘍効果の判定は実施例 10と同じ値を使用した。

第6 関は第5 圏と関係に対照群とA1.410を 500 μ8 投与群について、経道細胞移植後の日数経過 に対して生残しているマウスの割合をグラフに示

### したものである。

## 表 7 モノクローナル抗体AI.410の T細胞白血病EL4に対する抗損瘡効果 (接種解監数1×10\*)

æ	投与量 (µg)	MSD (H)	I L S	60日間 生残数
対照群	0	22.5	0	0/9
87 44 RE	500	60.5	62.2	1/5

# 実施例12 (モノクローナル抗休A1.410の抗酸緩 効果その3)

対照郡の動物数を8近。接種期遊数を1×10<sup>1</sup>個、接種行法を皮下移植とし、モノクローナル信体の 数 年方法を静蘇投 4(1v)と 截腔円投 5(1s)の両方 で行なった。他は実施例 1 0 と同じ条件で実験を 行なった。

結果を表8に示す。抗腫癌効果の判定は実施例 10と同じ値を使用した。

表 8

モノクローナル抗体A1.410の T組施自血病EL4に対する抗腫瘍効果

<ul><li>(接種細胞数1×1)</li></ul>	٥٠,	)
------------------------------	-----	---

(ITE	役与量 (μg)	MSD (H)	I L S	6 0 日 ! 生残数
対照群	0	22.3	0	0/8
	20	26.5	18.8	0/5
iv投与	100	31.5	41.3	0/5
	500	44.5	99.6	2/5
	20	25.5	14.3	0/5
ip投与	100	37.5	68.2	0/5
	500	39.5	77.1	2/5

実施例10、実施例11および実施例12の結 果から割るように、モノクローナル抗体A1.41の 没与によりマウス下網跑白血病の増殖は著しく抑 組まれ、彼は蜂組硬筋は相続されるに至ったこと

が示された。

実施例13 (モノクローナル抗体\*1.425の抗腫症 効果その1)

実験動物としては C578L/6マウスを対照所は14 に、試験群はモノクローナル技体の原生景により 2 部に分け、キマ5 E2使用した。移植環窟により 2 部に分け、キマ5 E2使用した。移植環窟には 8L4を使用し、2×10\* 個数股内に接待した。翌日 場際護衛 監照被0.2±3に潜かした100±x×は500 μgのセノクローナル技体41.425 を設備に、対 風窟には同量の薄酸減り返額成のみを距離内に投 少し、マウスの色死を60日間刷膜した。

結果を表9に示す。なお、抗腫癌効果の判定に はMSD(Median Survival Day: 生存日数中央航)と ILS(Increased Life Span=(T-C)/C; 延命半)を 用いた。

また第7 図には対照群とA1.425を500μ ε投与桁 について、腱道細胞移植後の日数経過に対して生 変しているマウスの割合をグラフに示す。

表 9 モノクローナル杭体A1.425の T細胞白血病EL4に対する杭隆編効果

### (接種細胞数2×10°)

81	役与量 (με)	м S D (Н)	ILS (%)	60日間 生残数
対照群	0	22.0	0	0/14
	100	24.5	11.4	1/5
数与群	500	>60.0	>172.7	3/5

# 災海倒14 (モノクローナル抗体A1,425の抗腫液 効果その2)

対照群の動物数を 8 匹、接種細點数を1×10<sup>6</sup> 個、接種方法を皮下移植、モノクローナル抗体の投与 量を500 μ g だけとした他は実施例 3 と同じ条件で 実験を行なった。

析果を表10に示す。抗腫瘍効果の判定は実施 例13と同じ値を使用した。

第8図は第7回と同様に対風罪とA1.425を 500 με 投与群について、腫瘍顧應移植後の日数経過 に対して生残しているマウスの割合をグラフに示

### したものである.

表 10 モノクローナル抗体A1.425の T細胞白血病BL4に対する抗腫癌効果

### (接種細胞数1×10°)

112	投与量 (μg)	м S D (日)	1 L S	60日間 生残数	
対照群	0	22.5	0	0/9	
投与群	500	39.5	75.6	1/5	

実施例13. および実施例14の結果から判る ように、モノクローナル抗体A1.425の投与により マウス下網路自血溶の増殖は著しく抑制され、 確は移植経療体能絶されるに至ったことが示され

成は移植鰻癬は拒絶されるに至ったことが示され た。

### 4.図面の簡単な説明

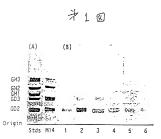
第1回は左のレーンから、ガングリオシド組品 の混合物 (Gr31-GR2-GR1-GR3-GR2)をTLCにかけてレ ゾルシノールで映色したもの、ヒトメラノーマ戦 弱壊和1のガングリオンド分演をTLCにかけてレゾ ルシノールで映色したもの、\*14 のガングリオシ ド分離をTLCにかけた後 A1.267、A1.410及びA1.4 25で酵素免疫染色を行なったものである。

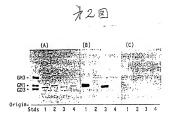
第 2 所(A)は4 倍頭のGO3を TLCにかけ、レゾル レノールで後色したものである。左からガングリ メンド端晶の混合物 (GR3・GR1・GO3)、レーン器 号 LはGD3 (Neu Ac, Neu Ac)、レーン器号 2 はGD3 (Neu Ac, Neu Gc)、レーン器号 3 はGD3 (Neu Gc, Neu Ac)、レーン器号 4 は GD3 (Neu Gc, Neu Gc)である。第 2 所は Al. 267、Al. 410 及びAl. 475によるT LCCの酵素免疫染色の結果である。レーン器号と GD3の機能は技術である。

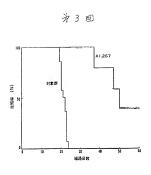
第3回、第5回及び第7回には、C57/BL6 マウスを用い、移植航爆起としてこれと同系(syngenoic) の 可期陷臼 血料細胞核 E44を使用し、2×10<sup>4</sup> 側 放設内に接種したものに対して、対似群と A1.25 A1.410及びA1.425をそれぞれ500μ 度 投与した がについて、原癌 細胞移植後の日数性過と生残マウスの数の関係をグラフに示す。

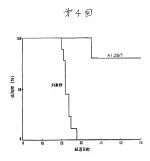
第4回、第6回及び第8回は、接種細胞数を1 ×10<sup>5</sup>例、接種方法を皮下移植とした他は第3回 と同じ条件で実験を行ない、対風群と A1.267、A 1.410及びA1.425をそれぞれ500 p e 設与した群に ついて、尿路期階移補後の日数経過と生現マウス の数の関係をグラフに示したものである。

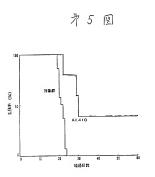
代理人 华理十 戸 田 奴 県

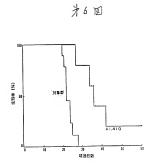






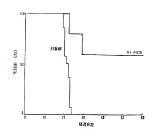


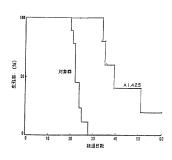




才 8 图







### 手 終表 有性 (自奉)

昭和63年 8月18日

特許庁長官

1. 事件の表示

特和63年 特 許 顧 第95724号

2. 発明の名称

抗 腫 걜 剤

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

東京都中央区京橋2丁目3番6号

(613) 明治乳業株式会社

代表者 島 村 骑 三

4. 代 理 人

住 所 〒105東京都機区虎ノ門一丁目19番14号

邦楽ビル503

なし

弁理士(7577) 戸 田 親

電話 508-0333

5. 補正により増加する発明の数

53. 8, 18 · 4: 50 (25 二 48 )

### 6.補正の対象

## 明維養

## 7. 捕正の内容

(1) 明期書21頁10~16行を次のとおりに補正す

『第1図はガングリオシド頼品の混合物(GM3+GM2 +GH1+GD3+GD2)及びヒトメラノーマ細胞株H14のガ ングリオシド分面を TLCにかけたのち、レゾルシ ノール或いは酵素免疫染色法で染色した図である。 (A)はTLCをレゾルシノールで染色したものであっ て全てのガングリオシドが染色されるため、 TLC 上のガングリオシドの位置が示されている図で レーン名Stdsはガングリオシド輔品の混合物(GN3) +GM2+GM1+GD3+GD2)、レーン名M14はヒトメラノー マ細胞株N14のガングリオシド分画である。(B)は ヒトメラノーマ細胞株別414 のガングリオシド分面 の TLCを様々なモノクローナル抗体により酸素係 疫染色法で染色した図である。これらのうちレー ン番色 3 がA1.267による酵素免疫染色の結果であ る。なお、左の GM3、GM2、GM1、GD3及びGD2はそ

れぞれTLC上の位置を示している。』

(2) 明棚書25頁 5~13行を次のとおりに補正す z

(3) 明細書31頁7~13行を次のとおりに補正する。

(NeuGc, NeuGc))とモノクローナル抗体のTLCプレート上で酵素免疫染色法の結果は第2階に示されている。

第2回はガングリオシド純品の混合物(GN3+GN1 +GD3)及び4種類のGD3をTLCにかけたのち、レゾ ルシノール或いは酵素免疫染色法で染色した図で ある。(A)はTLCをレゾルシノールで幼仏したもの であって全てのガングリオシドが染色されるため、 TLC上のガングリオシドの位置が示されている 図で、レーン名Stdsはガングリオシド純品の混 合物(GM3+GM1+GD3)、レーン番号1はGD3(NauAc. NeuAc)、レーン番号2は GD3(NeuAc, NeuGc)、レ ーン番号3は GD3(NeuGc, NeuAc)、レーン番号4 は GD3(NeuGc, NeuGc)である。(C)がTLCをAl.410 により酵素免疫染色した結果を示す図である。レ ーン番号とGD3の種類は(A)と同じである。また、 左のGM3、GM1及びGD3はそれぞれのTLC上の位置を 示している。この図の(C)から判るように、A) 410はこれらのGD3の何れとも反応しなかった。』

(5) 明相書38頁7~13行を次のとおりに補正す

『第 1 回はガングリオシド結品の辺会物(GN3+GN2 +GM1+GD3+GD2)及びヒトメラノーマ制的株 M14のガ ングリオシド分面を TLCにかけたのち、レゾルシ ノール或いは酵素気疹染色法で物色した図である。 (A)はTLCをレゾルシノールで炒んしたものであっ て全てのガングリオシドが塩色されるため、 TLC トのガングリオシドの位置が示されている図で、 レーン名Stdsはガングリオシド頼品の混合物(GM3) +GM2+GM1+GD3+GD2)、レーン名M14はヒトメラノー マ知胸株H14のガングリオシド分面である。(B)は ヒトメラノーマ細胞株M14 のガングリオシド分画 の TLCを様々なモノクローナル抗体により酸素魚 推築色法で染色した関である。これらのうちレー ン番号 5 がA1.410による酵素免疫染色の結果であ る。なお、左の GM3、GM2、GM1、GD3及びGD2はそ れぞれTLC上の位置を示している。」

(4) 明報書32頁最下行から33頁5行までを次の とおりに納正する。

『次に4種類のGD3(GD3(NeuAc, NeuAc)、GD3 (NeuAc, NeuGc)、GD3(NeuGc, NeuAc)、およびGD3

χ.

『第1図はガングリオシド純品の混合物(GH3+GH2 +GM1+GD3+GD2)及びヒトメラノーマ細胞株 M14のガ ングリオシド分置を TLCにかけたのち、レゾルシ ノール或いは酵素免疫染色法で染色した肉である。 (A)はTLCをレゾルシノールで込みしたものであっ て金てのガングリオシドが染色されるため、 TLC 上のガングリオシドの位置が示されている図で、 レーン名Stdsはガングリオシド結品の混合物(GN3 +GM2+GM1+GD3+GD2)、レーン名M14はヒトメラノー マ 制 胞 株 H L 4 の ガングリオシド分 面 で ある。(B) は ヒトメラノーマ細胞株M14 のガングリオシド分面 の TLCを機々なモノクローナル抗体により酸素の 疫染色法で染色した図である。これらのうちレー ン番号6が41.425による除海免疫染色法の結果で ある。なお、左の GM3、GM2 GM1 GD3 は78 GD2 は それぞれTLC上の位置を示している。』

(6) 明和書40頁 5~14行を次のとおりに補正す ス

『第2図はガングリオシド純品の混合物(GM3+GM1

\*GD3)及び4種類のGD3をTLCにかけたのち、レゾ ルシノール或いは酵素免疫染色点で染色した固で ある。(4)はTLCをレゾルシノールで染色したもの たちって全てのガングリオシドが染色されるため、 TLC上のガングリオシドの位置が示されている 関で、レーン名Stdaはガングリオンド新島の膜 合物(GM3-CH1+GD3)、レーン番号 1 はGD3(Neude, Neude)、レーン番号 2 は GD3(Neude, NeuGe)、レ ーン番号 3 は GD3(NeuGe, NeuGe)、レーン番号 4 は GD3(NeuGe, NeuGe)である。(C)がTLCをA1.425 により酵素免疫染色した結果を示す図である。レ ーン番号 CD3(NeuGe, NeuGe)との に力酵素免疫染色した結果を示す図である。レ ーン番号 CD3(NeuGe)である。(C)がTLCをA1.425 により酵素免疫染色した結果を示す図である。よ により酵素免疫染色した結果を示す図である。また、 生のGM3、GM1及びGD3はそれぞれTLC上の位置を示 している。この図の(C) から刺るように、A1.425 はこれらのGD3は行れとも反応しなかった。よ

(7) 明細書50頁下から5行から51頁2行までを なのとおりに補正する。

『第1図はガングリオシド純品の混合物(gM3+GM2 +GM1+GD3+GD2)及びヒトメラノーマ網路体M14のガ ングリオシド分画を TLCにかけたのち、レゾルシ ノール点いは酵素免疫染色法で染色した関である。
(A) はTLCをレゾルシノールで染色したものであって全てのガングリオンドが染色されるため、「TLC 上のガングリオンドが染色されるため、「TLC レーン名Stdaはガングリオンド飼品の混合物(GN3 \*GN2\*GN1+GO3\*GO2)、レーン名N14はヒトメラノーマ細胞株N14のガングリオンド分間である。(B) はヒトメラノーマ細胞株N14のガングリオンド分間のTLCを編々なモノクローナル技体により酵素炎度染色法で染色した関である。これらのうちレーン番号3がA1、267、レーン番号5が41、410、レーン番号6がA1、425による酵素炎疫染色法の結果である。また、たの GN3、GN2、GN1、GO3及びGO2はそれぞれTLCとの位置を示している。2

### 手統補正書(方式)

/0 28 昭和63年 -8月1=8日

特許 庁 長 宜 殿

1. 事件の表示

特和63年 特 許 顧 第95724号

2. 奈明の名称

抗髓髓制

3. 稲正をする者

事件との関係 特許出願人

住 前 市市都由中区市场2下日3番6号

R 称 (613)明治乳浆株式会社

代表者 島 村 靖 三

4. 代 理 人

住 所 〒105東京都港区成ノ門一丁目19番14号

邦楽ピル503

氏名 弁理士(7577) 戸 田 親 男 電話 508-0333

5. 補正命令の日付

発送日 昭和63年7月20 6. 補正により増加する発明の数



# 7. 補 正 の 対 象 明細書 みい 回 面 8. 綿 正 の 内 容

(1) 明細書51頁3~11行までを次の文に補近す

第2回はガングリオシド純品の混合物(GM3+ GM1+GD3)及び4種類のGD3をTLCにかけたのち、レ ゾルシノール或いは酵素免疫染色法で染色した関 である。(A)はTLCをレゾルシノールで染色したも のであって全てのガングリオシドが染色されるた め、TLC 上のガングリオシドの位置が示されてい る図で、レーン名Stdsはガングリオシド無品の混 合物(GM3+GM1+GD3)、レーン番号1はGD3(NeuAc.N euAc)レーン番号 2 はGD3(NeuAc, NeuGc)、レーン 番号3はGD3(NeuGc, NeuAc)、レーン番号4はGD3 (NeuGc.NeuGc)である。(B)はTLCをA1.267により 酵素免疫染色した結果を示す関である。レーン指 共とGD3の種類は(A)と同じである。(C)はモノク ローナル抗体A1.410及びA1.425によりTLCを酵素 免疫染色した結果を示す図である。 レーン番号 とGD3の種類は(A)と同じである。 また、左の

- GNO. GMI及び GD3はそれぞれのTLCの位置を示している。』
- (2) オーへ8回で到紙のとおり補正する。

第 1 図

(A) (B)

Stds M14 1 2 3

5

